

第2977241号

(45)発行日 平成11年(1999)11月15日

(24)登録日 平成11年(1999)9月10日

(51) Int.Cl.⁶
 C 12 P 21/00
 // C 12 N 1/20
 15/09
 (C 12 P 21/00
 C 12 R 1:19)

識別記号

F I
 C 12 P 21/00
 C 12 N 1/20
 15/00

C
 A
 A

BEST AVAILABLE COPY

請求項の数6(全5頁)

(21)出願番号 特願平2-202616
 (22)出願日 平成2年(1990)8月1日
 (65)公開番号 特開平3-76595
 (43)公開日 平成3年(1991)4月2日
 審査請求日 平成9年(1997)6月19日
 (31)優先権主張番号 P 39 25 550. 6
 (32)優先日 1989年8月2日
 (33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(73)特許権者 99999999
 ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国フランクフルト・ア
 ム・マイン (番地なし)
 (72)発明者 マテイアス・グローテ
 ドイツ連邦共和国デ-3550 マルブル
 ク・グラデンバヘルヴェーク65
 (74)代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)
 審査官 新見 浩一

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)
 C12P 21/00 - 21/02
 C12N 15/00 - 15/90
 BIOSIS (DIALOG)
 WPI (DIALOG)
 EPAT (QUESTEL)

(54)【発明の名称】 大腸菌中での外来性タンパク製造のための最適化発酵法

1 【特許請求の範囲】

【請求項1】ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中の外来性タンパクの製法であって、IPTGによる誘導及び炭素源としてグルコースを用いる場合には、酸素分圧が10%より大きいか又はそれに等しくなるようにグルコース濃度をコンコールすることを特徴とする上記の方法

【請求項2】ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中の外来性タンパクの製法であって、炭素源又は天然誘導因子としてラクトースが使用される場合には、酸素分圧が10%より大きいか又はそれに等しくなるようにグルコース濃度をコンコールすることを特徴とする方法

【請求項3】ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中の外来性タンパクの製法であって、

炭素源及び天然誘導因子としてラクトースが使用され、更に誘導因子としてIPTGが使用される場合には、酸素分圧が10%より大きいか又はそれに等しくなるようにグルコース濃度をコンコールすることを特徴とする方法

【請求項4】次の方法の構成要素の少なくとも1つが明記される請求項1、2又は3に記載の方法

1. 好きに10%迄のラクトースを含有する発酵液、2. 好きな酸素濃度は維持されること、及び通気量及び搅拌速度は100rpm迄の範囲で選択、3. 溫度を30°C迄の可能な温度まで低下させる

4. 上記の方法に見合ひの酵母を用いること、5. 上記の酵母を用いて

6. 上記の酵母の活性を維持する方法

【請求項5】請求項1の発酵法を用いて得た

Reference 2

Japanese Patent No. 2977241

Disclosed is an optimized fermentation method (conditions) for producing foreign proteins, specifically lipocortine-related proteins in *E. coli* under the control of an inducible lac-promoter. The inventor found a novel method in which volumeric yield of the product can be increased by factor of 5 compared with conventional methods by controlling the time and amount of glucose (lactose) addition through which the oxygen partial pressure in the culture medium is maintained at least 10% (i.e. glucose limitation). The yield can further be improved by increasing the oxygen pressure using at least one of the means selected from the followings:

(a) fermentation under up to 2 bar overpress, (b) increasing the stirring rate and the aeration rate up to 2 vpm, and (c) lowering the temperature from 37 to 30 degree C. The advantage of this method is that it does not require particular equipment for aeration of highly pure oxygen and prevention of explosion of the oxygen.

発酵させる請求項1、2、3又は4記載の方法。

【請求項6】 cDNAがPP4、PP4- α 又はPP4の突然変異体及び変異体をコードする請求項5記載の方法

【発明の詳細な説明】

本発明は、lacプロモーター又は改良lacプロモーター(例えばlac, lacZ)を使用して大腸菌中外来性タンパクを製造するための最適化発酵法を記述する。炭素源としてグルコースを用いる初期増殖相の後、(1)グルコース制限下IPTGによるか又は(2)ラクトースによるか又は(3)ラクトース制限下IPTG及びラクトースにより生成物形成の誘導が行われる。グルコース又はラクトースの制限は、酸素分压が10%を超えて保たれるようにする。

大腸菌中多種の遺伝子組替タンパクを商業的な量製造することは原理的に周知である。これらのDNAバスクの発現は、適当な配列をもつマルチコピークローン中にはコードするcDNAをクリーンすることによって可能となる。

このことについての実験は、普通振盪フラスコ中実施される。この場合遺伝子組替各々の収量は、100ml充満の容量をもつ振盪フラスコ中の培養が用いられたとき普通50~100mg/lである。

これらの技術を用いて遺伝子組替タンパクの製造に成功することは可能であるが、タンパク濃度及び製造可能な量を明らかに増大させる技術の必要性がある。これらが必要に適合する上での試みが発酵法の開発である。従って本発明の目的は、大腸菌中外来性タンパクの発現のための発酵法の最適化である。

前要件がなされたも部分的には満足されているいくつものこのような方法が文献に記載されている。このうちの場合lacプロモーターを使用することは、通常は、大腸菌、ガラクタ-シラーゼタランバク(β-Gal)をもつ組替タンパクが製造されたことを意味している。この発酵における収量は普通リットルあたり融合ターン-off 0.3~1.0である。融合型β-Galタンパクを考えるときには、実際の生成物濃度は、該性の30%に低下することが多い。更に、生成物からβ-Galタンパクを除去するため高密度精製処理を要する。

本発明は、ないむすび、成熟した生成物の発現、即ち後工程が除かなければならぬ融合生成物の除去、生成物の発現を記述する。このような方法によて生成物の精製が比較的単純に行われる。しかし、発酵法がフラスコ中生成物の生存及び容量収量(500ml, 1000ml, 10000ml)をもつて普通的な、従い、この方法の生成物が可溶性かつ、生物学的に活性の形態で製造されるところ、これを特徴的である。活性で外れた封入体として既知されるターン-offタンパクの生成と異なり、可溶性の生物学的に活性な生成物は、通常の発酵法によれば、大腸菌中外来性タンパクを用いることである。また、大腸菌のlacプロモーターは容易に分解されることである。これを考慮して、lacプロモーターは、lacZを導入して使用される。

られ、イソブロピルチオガラクトシド(IPTG)が誘導のために使用された今日までの方法において生物学的に完全に活性な生成物の200mg/lの収量を得ることが可能であった。

発酵を最適化するため、本発明は増殖率及び生成物形成の改善を課題とした。生成物は細胞の内部に形成されるので、生成物の比濃度(specific product concentration) (細胞当たり生成物の量) 及び細胞数が重要である。この2つの因子の積がリットルあたりグラム(g/l)の方法の容量生産法である。

高細胞密度発酵は、遺伝子組替大腸菌についてしばしば文献に記載されている。リットル(l)あたり乾燥物(DM) 30gまでの細胞密度がこれに関連して述べられており、遺伝子組替大腸菌10株を150ml、100ml中の50g DM/lの細胞密度まで発酵させる方法を開発することが可能となっている。本発明において本質的な点は、取入れ空気の酸素強化の後述される方法の1条件ではないことである。基質としての純酸素は高いコストを生じ、その上、爆発防止手段を省くことが可能である。このことは方法の経済性に有利な効果を有する。

高い用量生成物収量をもつ方法について重要な因子は、プロモーターの最適誘導である。IPTGによる誘導は、前述した従細胞密度の場合に実施されており、文献は多數記載されている。IPTG(1mM~10mM)、好ましくは5mMによる誘導及び酸素分圧(10%)より大きさ、又はそれに等しくなるような基質としてグルコースの制限の後回数は、0.25/lから1.0g/lまでの容量收量の改善が達成されることが見出された。

本発明の第2の実施態様は、初期振盪時間及び初期リソグリューゼーとしてラクトースを用いる増殖の場合の生成物形成の誘導である。酸素分圧は、ラクトースの添加をコントロールすることによって上と同様に: pHより大きいか又はそれに等しい水溶液に保たれた。ラクトースによる誘導は、この操作がIPTG誘導より効率が低いといわれているので、次第において最適に至らないと見なされている。現在まで、ラクトースをインキュベーターとして用いる効率の高い発酵法は記載されていない。本発明による実験の試みは、おもい生成物の形成の方法が大腸菌の固有の代謝に対して小さい妨害効果を有している。即ち、振盪、誘導、即ちその生成物の形成の方が生成物よりも最終濃度を確実に保ててできると、この考察に基づいている。この試みは、初期として2株の細胞密度は、0.1~0.25/lの初期細胞密度が達成されて過度な振盪において確実に保たれている。増殖と貯蔵期におけるラクトースの添加は、pHより大きい水溶液に保たれて、この操作は、pH3による誘導をもたらす方法と實験している。発酵の初期における活性の測定性の範囲内では、(1)を用いる酸素の生存を考慮するためラクトースの作用が実験されとき、この方法が第3の方法に比べて効率的。

スによる誘導を更にIPTG添加によって助けることが可能であった。この追加のIPTG誘導は、特定の選ばれた発酵装置の入力が培養物に酸素を供給するのに不十分であるときのみ必要である。上述した第2の方法においてプラスミド損失の増大が観察されるので、スケールアップの際には発酵容積が増大するに従って安差する点があり、ラクトースによる誘導の際プラスミド損失のわずかな増大が観察されるので、その後最初は第2、次に第1の方法の方が経済的である。

生成物の濃度が最大になる時点で発酵を停止する。当業者に知られている処理を使用して生物体を濃縮（例えば分離器中）、崩壊（例えば高圧ホモジナイザー中）させる。細胞フラクションの沈降の後では、生成物の大部分は透明になった上清中に含まれている。

従って、本発明は、lacプロモーター又は最適化lacプロモーターのコントロール下大腸菌中外来性遺伝子の発現のための最適化発酵法であって。

(1) IPTG、同時に基質制限されたグルコース添加、そしてグルコース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによるか、

(2) 又は炭素源及び同時に天然インデューサーとしてラクトース、ラクトース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによるか、

(3) 又は炭素源及び同時に天然インデューサーとしてラクトース、そして更にIPTG、ラクトース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによって対数増殖期の終末において誘導が行われる方法に関する。

この方法の好ましい変法においては、各々の場合酸素分圧を次の手段のうち1つ又はそれ以上によって増大さ

せる：

- (a) 好ましくは2バルまでの、超大気圧下の発酵
- (b) 入力・搅拌速度を増大させること及び通気速度(2vvmまで)、のコントロールされた追跡
- (c) Henry係数の改善及び代謝活性の低下により、酸素移行速度を増大させかつ酸素吸込み速度を低下させる（バッチの大きさ（＝容器）が増大すると共に比入力(specific power input)が減少するので1,000ℓを超えるスケールアップの際必要）ために温度を37℃から30℃に至るまで低下させること、

炭素源として糖基質の添加が最大値5～10g/lにコントロールされること及び全発酵期間pHがpH6.7～pH7.3の範囲にNH₄OH及びH₃PO₄の添加によってコントロールされることは、この方法の変法のすべてに共通である。

上述した方法は、lac-PP4及びPP4-x（これらはアリボコルチンに属する（Grundmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85 (1988) 3708～3712））ならびにそれらの突然変異体（mutant）及び変異体（variant）の遺伝子生物学的製造に好ましく用いられる。

本発明は、実施例及び特許請求の範囲において更に説明されている。

実施例

次の実施例は大腸菌K12株W3110 lac 10 (Brent及IPashne (1981) Proc. Acad. Natl. Sci. USA 78, 4204～4208)の発酵を記述るもので、この菌株は、プラスミドpGE99A-PP4 (Amannら (1988) Gene 69, 301～315) 又はpGE99A-PP4-x (Grundmannら (1988) Behring Inst. Mitt. 82, 59～62) を用いて遺傳子交換されている。

表1は極めて過している培地を示す。

表 1

生育培地の1例の組成
(リットルあたりg又はmg単位のデータ)

炭素源(糖)必要に応じ

イーストエキス	20g
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	1.2g
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	8.5g
KCl	1.0g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	2.0g
クエン酸	0.25g
NH ₄ Cl	5.0g
チアミン	5.0mg
H ₃ BO ₃	2.0mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4H ₂ O	0.8mg
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0.16mg
KI	0.4mg
MnSO ₄ × 7H ₂ O	2.02mg
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	1.6mg

発酵は8lの発酵容量をもつ10lのBostat Eファーメンター(製作者: Brau Melsungen)中実施された。

発酵の間プラスミド含有細胞に対して選択圧力はかけなかった。即ち発酵は抗生素質の添加なしに実施された。ファーメンターは一夜の振盪フラクション培養物を接種した。増殖の初期相において炭素源としてグルコースを用い、この相において0.1摩耳満の酢酸が生成するようグルコースをはかり入れた。酢酸濃度が増大すると生成物の収量は有意に低下した。増殖の初期相中10~15時間後、約5000cfuの細胞叢度が達成され、生成物形成の説導は次の3つの異なる別的方式で行われた。

(1) 1~10mMの IPTG(好ましくは5mMの IPTG)の添加
或グルコースのはかり入れを継続

増殖の初期相の終末において、炭素源としてグルコース

ス(「基質」)のはかり入れを継続しながら1~10mMの IPTG(好ましくは5mMの IPTG)を添加することによって生成物の形成を説導した。この場合生成物形成の速度は、その時におけるグルコース濃度への明らかな依存性を示した。実際の基質としてグルコース及び見上の基質として IPTG は競合する基質と思われ、シオカラード法則は従って、グルコースは 300mM で活性化を部分的又は完全に抑制した。この場合は 2.1924 又は 2.24 × の収量がグルコース制限系(2.192 1 摩耳満のグルコース叢度)における得られる。

グルコースの制限は、ポンプを設置することによるか又はオンラインHPLC測定を用いて実施された。細胞の増殖速度は、非制限系中説導によって低下しなかったが、予期されたとおり制限系中グルコース濃度の開放セ